

Eine neue enzymatische Peptidsynthese

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS RUDOLF MÜLLER

aus Schaffhausen und Winterthur

Basel

Buchdruckerei E. Birkhäuser & Cie., AG.

1951

Eine neue enzymatische Peptidsynthese

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS RUDOLF MÜLLER

aus Schaffhausen und Winterthur

Basel

Buchdruckerei E. Birkhäuser & Cie., AG.

1951

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Prof. Dr. *T. Reichstein* und PD. Dr. *M. Brenner*.

Basel, den 14. November 1950.

Prof. Dr. *R. Wizinger*,
Dekan.

Herrn *Hans Rudolf Müller* wurde von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 14. November 1950 erlaubt, diesen Teildruck seiner am 14. November 1950 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

Eine neue enzymatische Peptidsynthese

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Chemischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.



MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Herrn Prof. Dr. *T. Reichstein* und Herrn PD. Dr. *M. Brenner* möchte ich für ihre stete Hilfe und ihr reges Interesse, das Sie dieser Arbeit entgegenbrachten, herzlich danken.

Eine neue enzymatische Peptidsynthese.

Die Eiweissynthese in der tierischen Zelle geht wahrscheinlich zum überwiegenden Teil von präformierten Aminosäuren aus¹⁾. Dem tierischen und eventuell auch dem pflanzlichen²⁾ Organismus fällt somit die Aufgabe zu, Aminosäuren unter fortgesetztem Aufbau von Peptidbindungen CO—NH zu Peptiden und Proteinen zusammenzusetzen. Über die Mittel und Wege, welche ihm hierzu zur Verfügung stehen, wissen wir nichts Genaues³⁾. Vorläufig ist nicht einmal bekannt, auf welche Weise zwei α -Aminosäuren biologisch zum Dipeptid verknüpft werden. Die Aufklärung des Mechanismus, welcher dieser und ähnlichen Reaktionen zugrunde liegt, bildet ein Hauptproblem der modernen Biochemie.

Von grundlegender Bedeutung für jede Betrachtung der natürlichen Peptidsynthese ist der Umstand, dass die direkte Kondensation zweier Aminosäuren zum Dipeptid infolge der aufzuwendenden Ionisierungsarbeit eine endergone Reaktion darstellt⁴⁾. Ein solcher Prozess verläuft auch in Gegenwart von Katalysatoren nicht freiwillig. Es ist dementsprechend nie gelungen, ein echtes zwitterionisches Dipeptid oder Tripeptid mit Hilfe irgendeines Fermentes aus Aminosäuren zu synthetisieren. Eine direkte Umkehrung der bekannten enzymatischen Peptidhydrolyse zum Zwecke der Peptidsynthese ist im Reagenzglas nicht möglich. Wollte man sie in der belebten Natur dennoch postulieren, so würde dies sehr weitgehende Annahmen über die Fähigkeit der Zellen zur direkten oder indirekten Konzentrationsregulierung bedingen⁵⁾. Der Gedanke hat trotzdem eine grosse Rolle gespielt⁶⁾, ist dann aber, soweit er die niederen Peptide betrifft, aufgegeben worden⁷⁾.

¹⁾ D. Rittenberg & D. Shemin, *Ann. Rev. Biochem.* **15**, 247 (1946); F. Friedberg, T. Winnick & D. M. Greenberg, *J. Biol. Chem.* **169**, 763 (1947); K. Bloch & H. S. Anker, *J. Biol. Chem.* **169**, 765 (1947); H. Borsook, C. L. Deasy, A. J. Haagen-Smit, G. Keighley & P. H. Lowy, *J. Biol. Chem.* **174**, 1041 (1948); P. C. Zamecnik, I. D. Frantz, R. B. Loftfield & M. L. Stephenson, *J. Biol. Chem.* **175**, 299 (1948).

²⁾ E. H. Street, *Adv. Enzymol.* **9**, 391 (1949).

³⁾ F. Friedberg, T. Winnick & D. M. Greenberg, loc. cit.; P. P. Cohen & R. W. McGilvery, *J. Biol. Chem.* **171**, 121 (1947); K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **179**, 1245 (1949).

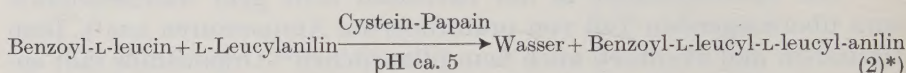
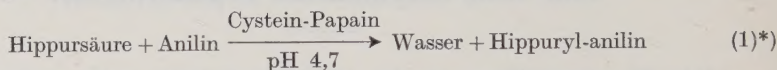
⁴⁾ H. Borsook & J. W. Dubnoff, *J. Biol. Chem.* **132**, 307 (1940).

⁵⁾ M. Bergmann & J. S. Fruton, *Ann. New York Acad. Sci.* **45**, 409 (1944).

⁶⁾ J. S. Fruton, in D. E. Green, *Currents in Biochemical Research*, New York 1946, S. 123.

⁷⁾ D. Rittenberg & D. Shemin, loc. cit.; P. P. Cohen & R. W. McGilvery, loc. cit.

M. Bergmann und Mitarbeiter haben gezeigt, dass der Misserfolg bei fermentativen Synthese-Versuchen nicht etwa einem Unvermögen der angewandten Fermente zuzuschreiben ist. Verkleinert man die normalerweise aufzuwendende Ionisierungsarbeit durch geeignete Wahl der Reaktionspartner, so werden enzymatische Synthesen, besonders wenn sich zufolge geringer Löslichkeit der Reaktionsendprodukte noch Verdünnungsarbeit gewinnen lässt, im Rahmen der Fermentspezifität durchführbar. Die nachstehenden Beispiele mögen dies verdeutlichen¹⁾.



*) Kristallisiert wegen Schwerlöslichkeit während der Reaktion aus und verhindert dadurch die Einstellung eines Gleichgewichtes (Gewinnung von Verdünnungsarbeit).

Es sei hervorgehoben, dass diese Umsetzungen wegen der grossen Energieunterschiede nicht mit dem Aufbau natürlicher Di- oder Oligo-Peptide vergleichbar sind und deshalb nicht ohne Einschränkung als Modellreaktionen für die Peptidsynthese gewertet werden dürfen.

Um der thermodynamischen Aussage über die Unwahrscheinlichkeit einer direkten Kondensation von Aminosäuren gerecht zu werden, nimmt man heute an, dass die Peptidsynthese auf dem Umweg über „aktivierte“ Zwischenstufen erfolgt. Hierbei ist unter der „Aktivierung“ einer Aminosäure ihre Umwandlung in ein reaktionsfähiges Derivat zu verstehen, das seinerseits den weiteren Aufbau zum Peptid gewährleistet. Eine derartige Umwandlung erfordert natürlich die Zufuhr von Energie. In der Tat haben neuere Forschungen eine Beziehung zwischen oxydativem Stoffwechsel und Peptidsynthese erkennen lassen.

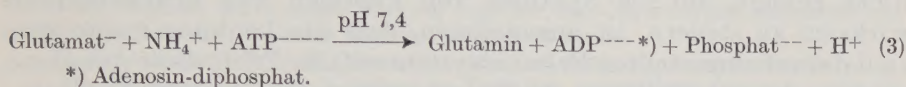
Der Nachweis eines solchen Zusammenhanges erfolgte zuerst am Beispiel der enzymatischen Benzoylierung und p-Aminobenzoylierung des Glycins. Obwohl diese Reaktionen nicht zu Peptiden im engeren Sinne führen, sind sie chemisch und energetisch mit dem Aufbau echter Peptide vergleichbar. Von der Synthese der Hippursäure und p-Aminohippursäure in überlebendem Lebergewebe ausgehend, haben *H. Borsook & J. W. Dubnoff*²⁾ sowie *P. P. Cohen & R. W. McGilvery*³⁾ folgendes gezeigt: Die genannten Verbindungen können auch in homogenisiertem Gewebe, ja sogar in Gegenwart gewaschener Zelltrümmer gebildet werden, wenn das Fermentsystem der Atmung wenigstens teilweise intakt ist und der notwendige „Brennstoff“ sowie Luft (Sauerstoff) vorhanden sind. Man weiss, dass unter solchen Bedingungen energiereiche Phosphate entstehen, und muss annehmen, dass die beobachtete Acylierung durch dieselben energetisch ermöglicht wird. Verhindert man nämlich die Entstehung der Phosphate durch Ausschluss von Sauerstoff, so kommt die Reaktion zum Stillstand. Sie lässt sich dagegen durch einen Zusatz von Adenosintriphosphat (ATP) als Energiespender auch anaerob aufrecht erhalten. Ähnliche

¹⁾ *M. Bergmann & H. Fraenkel-Conrat*, J. Biol. Chem. **119**, 707 (1937); **124**, 1 (1938). Weitere Beispiele in *C. L. A. Schmidt*, The Chemistry of the Amino Acids and Proteins, Springfield (Ill.) 1945, S. 1084. Vgl. ferner *S. W. Fox & C. W. Pettinga*, Arch. Biochem. **25**, 13 (1950); *S. W. Fox, C. W. Pettinga, J. S. Halverson & H. Wax*, Arch. Biochem. **25**, 21 (1950).

²⁾ J. Biol. Chem. **168**, 397 (1947).

³⁾ loc. cit.

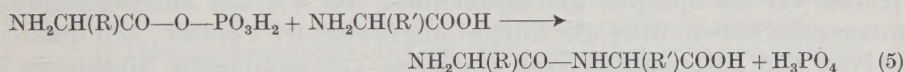
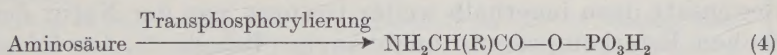
Verhältnisse hat *K. Bloch* in der Leber hinsichtlich der Synthese des natürlichen Tripeptids Glutathion vorgefunden¹⁾. *J. F. Speck* schliesslich gelangt auf Grund seiner Arbeiten über die Bildung des Glutamins in Gegenwart gereinigter Extrakte aus Taubenleber zu folgender stöchiometrischer Formulierung²⁾:



Das letzte Beispiel stellt wiederum keine Peptidsynthese im eigentlichen Sinne dar. Es zeigt aber wie die vorhergehenden, dass die Phosphatbindungsenergie am biologischen Aufbau der Peptidbindung bzw. Amidbindung massgeblich beteiligt ist.

Der chemische Vorgang jedoch, welcher die Beziehung zwischen den energiereichen Phosphaten und der Peptidsynthese vermittelt, ist unbekannt. Man weiss nicht, wie ein aktivierter Reaktionspartner zu formulieren ist. Wie noch gezeigt wird, sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Es kann sein, dass verschiedene Aktivierungsarten existieren und somit nicht alle Amidbindungen auf dieselbe Weise entstehen. Unterschiede, die zwischen dem Aufbau der Amidbindung im Glutamin und der ebenfalls phosphatabhängigen Acetylierung des Sulfanilamids (die sich in ihrer Art noch weiter von der Synthese echter Peptide entfernt als die Glutaminsynthese) beobachtet wurden³⁾, sind vielleicht als Ausdruck verschiedener Mechanismen zu deuten.

Lipmann u. a. stellen sich die Aktivierung der Aminosäuren als eine Phosphorylierung der Carboxylgruppen vor⁴⁾. Für die Synthese eines Dipeptids ergäbe sich auf Grund dieser heute fast allgemein akzeptierten Anschauung, die naheliegend und plausibel, keineswegs aber zwingend ist, folgendes hypothetisches Schema:



Modellversuche haben bestätigt, dass die Peptidbindung sich durch einen derartigen Vorgang aufbauen lässt: Glycin wird in neutraler wässriger Lösung durch Dibenzoylphosphat oder Benzoylphenylphosphat spontan zu Hippursäure benzoyleiert⁵⁾. Weitere experimentelle Stützen, insbesondere auch solche enzymatischer Art, die auf eine mögliche Lenkung einer Reaktion vom Typus der Gleichung (5) hindeuten würden, sind unseres Wissens nicht beigebracht worden.

¹⁾ loc. cit.

²⁾ *J. Biol. Chem.* **179**, 1405 (1949).

³⁾ *J. F. Speck*, loc. cit., S. 1424/25.

⁴⁾ *F. Lipmann*, *Adv. Enzymol.* **1**, 154 (1941); *P. P. Cohen & R. W. McGilvery*, *J. Biol. Chem.* **169**, 135 (1947).

⁵⁾ *H. Chantrenne*, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.* **26**, 297 (1948), *Biochim. biophys. Acta* **2**, 286 (1948), vgl. ferner **4**, 484 (1950).

Es scheint uns bei Erwägungen über den Aktivierungsmechanismus wichtig zu sein, dass das Problem der Reaktionslenkung nicht übersehen wird. Da die Aktivierung der Aminosäuren wahrscheinlich nicht genügt, um die Synthese von Peptiden und Eiweisskörpern wirksam zu steuern, ist anzunehmen, dass die Lenkung einem speziell darauf eingestellten Fermentsystem zufällt. Trifft diese Annahme zu, so sollte sich die Frage der Peptidsynthese auch von der fermentativen Seite her bearbeiten lassen. Die primäre Schwierigkeit bei einem solchen Vorgehen besteht natürlich darin, das betreffende Ferment-system aufzufinden. Dieses ist zur Erfüllung seiner Aufgabe an zwei Voraussetzungen gebunden, die seine Erkennung erleichtern: es muss einerseits über die zur Lenkung notwendige Spezifität verfügen, und andererseits eine messbare Affinität zu Peptiden oder Peptid-Derivaten und „aktivierten“ Aminosäuren besitzen. Es ist nun bemerkenswert, dass die proteolytischen Fermente die erste Voraussetzung ganz (Spezifität) und die zweite sicher zum Teil erfüllen (Affinität zu Peptiden). Ihre Wirkung auf „aktive“, d. h. potentiell zur Peptidbildung befähigte Aminosäurederivate ist vom Gesichtspunkt der Synthese aus nie überprüft worden.

Eigene Untersuchungen in dieser Richtung haben zu der interessanten Feststellung geführt, dass einige spezifische Aminosäuren durch Veresterung befähigt werden, in Gegenwart der Pankreasprotease Chymotrypsin¹⁾ mit sich selbst unter Bildung von Peptiden zu reagieren.

Die Fermentreaktion ist in bezug auf die Aminosäure-Seitenkette und das Ferment spezifisch (Tabelle 1) und in auffallendem Gegensatz dazu innerhalb weiter Grenzen von der Natur der alkoholischen Esterkomponente unabhängig (Tabelle 2). Im folgenden berichten wir am Beispiel des Methionins, das wir am eingehendsten untersucht haben, über die Entstehungsweise der Peptide, den qualitativen und halbquantitativen Nachweis von gebildetem Methionindipeptid und -tripeptid, sowie über die Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Zeit, dem pH, der Ester- und der Ferment-Konzentration. Anschliessend soll der Befund im Hinblick auf eine mögliche Beziehung zum Mechanismus der biologischen Peptidsynthese kurz diskutiert werden.

Die Entstehungsweise der Peptide.

An Fermenten standen uns zur Verfügung:

1. Kristallisiertes Chymotrypsin „*Armour*“; enthaltend rund 50% Ammoniumsulfat²⁾.
2. Kristallisiertes Chymotrypsin „*Lehn & Fink*“, enthaltend rund 50% Magnesiumsulfat³⁾.

¹⁾ Die Identität unserer Fermentpräparate mit Chymotrypsin ist nicht endgültig abgeklärt. Vgl. dazu S. 572 und die Diskussion auf S. 580.

²⁾ Bovine origin, lot 70902. *The Armour Laboratories, Armour & Company, Chicago, Ill.*

³⁾ *Plaut Research Laboratory, Lehn & Fink Products Corp., Bloomfield, N.J.*

3. Amorphes Chymotrypsin, nach *J. H. Northrop*¹⁾ aus viermal umkristallisiertem Chymotrypsinogen dargestellt.

4. Ein durch Dialyse und lyophiles Trocknen aus dem Pankreasenzym der *NOVO Terapeutisk Laboratorium A/S*, Kopenhagen, nach einer früher²⁾ angegebenen Vorschrift bereitetes Präparat, das in seiner Wirkung ungefähr dem Chymotrypsin entspricht und im folgenden kurz als „dänisches Ferment“ bezeichnet wird.

5. Kristallisiertes Trypsin „*Armour*“, enthaltend rund 50% Magnesiumsulfat³⁾.

Die Präparate 1, 2 und 3 zeigten im Verhalten gegen Methioninester qualitativ keine Unterschiede. Fast alle Versuche, über welche wir in dieser Arbeit berichten, sind mit „dänischem Ferment“ oder Chymotrypsin „*Armour*“ durchgeführt worden.

Tabelle 1.

Qualitatives Verhalten von Estern verschiedener Aminosäuren gegen kristallisiertes Chymotrypsin und kristallisiertes Trypsin¹⁾.

Ester	Peptidbildung		Verseifung der L-Form	
	Chymo.	Tryp.	Chymo.	Tryp.
DL-Threonin-isopropylester ²⁾	+++	(+)	++	(+)
DL-Methionin-isopropylester ³⁾	++	(+)	+++	+
DL-Phenylalanin-isopropylester ⁴⁾	+	? ⁸⁾	++++	(+) ⁸⁾
L-Tyrosin-äthylester ⁵⁾	+ ⁹⁾		++++	
DL-Tryptophan-methylester ⁶⁾	—	— ⁸⁾	+++++	+ ⁸⁾
DL-Valin-isopropylester ⁷⁾	—	— ⁸⁾	—	— ⁸⁾

¹⁾ *Armour*-Präparate, ca. 50% Ammoniumsulfat enthaltend.

²⁾ 100 Teile Ester, 100 Teile Wasser, 10 Teile Ferment, 22°, 40 Stunden. Diss. *E. Sailer*, erscheint demnächst.

³⁾ Trockener Ansatz bei 38° (vgl. Text) oder 0,17-m. in Wasser, 5 mg Ferment/10 cm³, 22°, 15 Stunden.

⁴⁾ Trockener Ansatz bei 38° oder 0,05-m. in Wasser, 3 mg Ferment/10 cm³, 22°, 15 Stunden.

⁵⁾ 0,19-m. in 30-proz. Methanol, 5 mg Ferment/10 cm³, 22°, 15 Stunden. Eine Verseifung wurde auch festgestellt bei c = 0,025-m. in 0,044-m. Phosphatpuffer (pH 8, 30-proz. Methanol), 0,2—0,3 mg Ferment-N/cm³, 15°; der Ester ist unter diesen Bedingungen schon nach 15 Minuten praktisch vollständig umgesetzt.

⁶⁾ Trockener Ansatz (Helv. **31**, 1908 [1948]) oder 0,17-m. in 30-proz. Methanol, 5 mg Ferment/10 cm³, 30°, 8 Stunden. Diss. *E. Sailer*, erscheint demnächst.

⁷⁾ Trockener Ansatz bei 38° oder 0,4-m. in Wasser, 10 mg Ferment/10 cm³, 22°, 18 Stunden.

⁸⁾ Nur trockener Ansatz.

⁹⁾ Die Peptide sind in diesem Fall noch nicht identifiziert worden (Dipeptid und Tripeptid?).

Wo besondere Angaben fehlen, sind die Versuche beim Eigen-pH der Lösungen durchgeführt worden.

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Ester des DL-Methionins gehen mit wenigen Ausnahmen, die sich durch ein hohes Molekulargewicht auszeichnen, in Gegenwart von 5% Wasser und 2% dänischem Ferment bzw. 1% krist. Chymotrypsin in ein Gemisch von

¹⁾ Crystalline Enzymes, New York 1939.

²⁾ *M. Brenner, E. Sailer & V. Kocher*, Helv. **31**, 1908 (1948).

³⁾ Bovine origin, lot 7291 X.

Tabelle 2¹⁾.

Peptidbildung bei verschiedenen Estern des DL-Methionins.

„Ätherunlösliches“ (= Gesamtreaktionsprodukt minus lipoidlösliche Anteile) und Peptidfraktion (= wasserunlöslicher Anteil am „Ätherunlöslichen“) aus 100 Teilen Ester, 5 Teilen Wasser und 2 Teilen dänischem Ferment nach 15–20 Stunden bei 38°. Vgl. experimenteller Teil, S. 587.

DL-Methioninester von ²⁾	Sdp. ° C/mm	Ätherunlös. % der be- rechneten Menge ⁴⁾	Peptidfrak- tion. % der berechneten Menge ⁴⁾	Verhältnis Peptidfrak- tion:Äther- unlös.
Methanol	126/13	50	14	0,28
Äthanol	133/16	56	13	0,23
n-Propanol	135/13	81	36	0,45
i-Propanol	128/11	91	30	0,33
Allylalkohol	149/16	80	30	0,37
Methylcellosolve	170/14	69	15	0,22
n-Butanol	149/14	67	23	0,34
i-Butanol	128/14	?	?	0,39
sek. Butylalkohol	145/13	91	39	0,43
n-Amylalkohol	173/16	65	24	0,37
Gärungsamylalkohol	161/15	88	36	0,41
t-Butylcarbinol	151/14	69	37	0,54
Diäthylcarbinol	155/15	81	37	0,46
2-Methylpentanol-(4)	159/13	78	39	0,50
Cyclohexanol	183/13	51	14	0,27
Benzylalkohol	129/0,04	84	19	0,23
Cycloheptanol	154/0,15	85	35	0,41
n-Heptanol-(2)	175/14	74	31	0,42
n-Octanol	156/0,2	79	26	0,33
Phenyläthylalkohol	152/0,15	90	33	0,37
n-Decanol ³⁾	151/0,05	71	17	0,24
n-Undecanol ³⁾	166/0,1	4	?	?
Laurylalkohol	158/0,02	—	—	—
7-Äthyl-2-methyl- undecanol-(4) ³⁾	168/0,05	—	—	—
Oleylalkohol	178/0,01 (Zers.)	—	—	—

¹⁾ Wir danken Fräulein Dr. S. Nobile für ihre Hilfe bei der Durchführung dieser Versuche.

²⁾ Die Herstellung der Ester erfolgte zum Teil mit alkoholischer Salzsäure nach Emil Fischer und teils durch Alkoholyse des Methylesters. Zur Darstellung des letzteren ist eine besonders einfache Methode unter Verwendung von Thionylchlorid entwickelt worden. Vgl. den experimentellen Teil und die demnächst erscheinende Diss. W. Huber.

³⁾ Reaktionsdauer 2 Tage.

⁴⁾ Berechnete Menge = L-Methionin in 100 Teilen DL-Ester.

Der wasserlösliche Anteil am „Ätherunlöslichen“ besteht in allen Fällen überwiegend aus L-Methionin.

schwer löslichen Produkten, freiem L-Methionin und unverändertem Ester über. Letzterer besteht zur Hauptsache aus der D-Form des angewandten Esters und kann auf D-Methionin verarbeitet werden¹⁾. Die Untersuchung der schwerlöslichen Produkte hat ergeben, dass sie peptidartig aus L-Methionin aufgebaut sind, indem ihre totale Hydrolyse zu L-Methionin²⁾ und ein partieller hydrolytischer Abbau zu L-Methionin-peptiden führt³⁾. Es liegt offenbar ein Gemisch von optisch aktiven Peptiden und ihren Estern von der allgemeinen Formel $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{CO}[\text{NHCH}(\text{R})\text{CO}]_x\text{NHCH}(\text{R})\text{COOR}'$ vor, wobei $x \sim 3-10^5$, $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ und $\text{R}' = \text{H}$ oder Alkyl ist. Seine Entstehung beruht primär auf einer ferment-induzierten linearen Selbstkondensation der L-Komponenten der racemischen Ester. Die Reaktionskette bricht ab, wenn die Produkte infolge zunehmender Molekulargrösse im Reaktionsmilieu unlöslich werden. Nach erfolgter Bildung scheint ein Teil der Peptidester durch sekundäre fermentative Einwirkungen auf die Peptidbindungen oder die Estergruppierung wieder bis zu einem gewissen Grade hydrolytisch gespalten zu werden. Im Reaktionsprodukt sind jedenfalls geringe Mengen Methionin-Dipeptid und -Tripeptid nachweisbar. Inwiefern auch das L-Methionin nicht durch direkte Esterverseifung, sondern durch einen Abbau von Peptiden entsteht, kann vorläufig nicht entschieden werden. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, dass die Inkubation der unlöslichen Peptidfraktion aus „nassen“ Ansätzen (vgl. unten) mit dänischem Ferment zu einer langsamen Freisetzung von Dipeptid und wenig Tripeptid bzw. Methionin führt (22°; pH 7–10, optimal bei 9; Toluol).

Die niederen Ester der Tabelle 2 sind teilweise ziemlich gut wasserlöslich. Es ist deshalb möglich, die Fermentreaktion auch in wässriger Lösung durchzuführen. Der Isopropylester, der sich durch eine verhältnismässig grosse Beständigkeit auszeichnet, ist hierzu besonders geeignet. Versetzt man eine gesättigte, etwa 0,34-m. wässrige Lösung dieses Esters (pH $\sim 9,2$) bei Zimmertemperatur mit etwas krist. Chymotrypsin (ca. 0,01 mg Protein-N pro mg Methionin-N), so tritt bereits nach einigen Minuten eine Opaleszenz auf, die ständig zunimmt und sich in einer Viertelstunde zu einer starken Trübung verdichtet. Nach 30–60 Minuten setzt sich ein flockiger Niederschlag ab, und die überstehende Lösung wird langsam wieder klar (pH ~ 8). Die Fällung, welche nach gründlichem Waschen mit Wasser und Trocknen gewichtsmässig 15–20 % des eingesetzten L-Methionins ausmacht, scheint auch hier ein „polymer-homologes“ Gemisch von L-Methioninpeptiden und ihren Estern zu sein. In der wässrigen Lö-

¹⁾ M. Brenner & V. Kocher, *Helv.* **32**, 333 (1949).

²⁾ M. Brenner & V. Kocher, *Exper.* **4**, 73 (1948).

³⁾ Vgl. eine spätere Abhandlung.

sung befinden sich neben unverändertem D-Ester und freiem L-Methionin beträchtliche Mengen Methionyl-methionin und Methionyl-methionyl-methionin. Dieselbe Reaktion tritt ein, wenn an Stelle von racemischem optisch aktiver L-Methionin-isopropylester verwendet wird. Der enantiomorphe D-Ester dagegen ist dem Chymotrypsin gegenüber beständig.

Ansätze in wässriger Lösung werden bei der weiteren Besprechung kurz als „nass“, solche in Gegenwart von nur wenig Wasser, das sich im Ester auflöst, als „trocken“ bezeichnet. Sämtliche Resultate der Tabelle 2 zum Beispiel beziehen sich auf trockene Ansätze.

Ester-Ferment-Gemische ohne Wasserzusatz bleiben unverändert. Auch in Kontrollversuchen ohne Ferment und solchen mit hitzeinaktivierten Präparaten ist keine Peptidbildung zu beobachten. Schliesslich bleibt die Synthese ebenfalls aus, wenn man im nassen Ansatz den Ester durch die äquivalente Menge freien DL-Methionins und etwas Natronlauge (pH 8–9) ersetzt.

Qualitativer und halbquantitativer Nachweis von Methionin-Dipeptid und -Tripeptid.

Für die Auftrennung wasserlöslicher Aminosäure-Peptid-Gemische und die Identifizierung ihrer Komponenten ist die papierchromatographische Methode am besten geeignet. Sie hat uns bei der analytischen Untersuchung der Fermentreaktionslösungen gute Dienste geleistet: Methionin, Methionyl-methionin, Di-methionyl-methionin und Methionin-isopropylester werden nach der im experimentellen Teil beschriebenen Arbeitsweise schon eindimensional vollständig voneinander getrennt. Die diesen Substanzen entsprechenden, durch Ninhydrin entwickelten Flecken finden sich auf dem Chromatogramm an charakteristischen Stellen und gestatten deshalb einen Vergleich zwischen Standardmischungen und unbekanntem Material. Die Identifizierung der Flecken wird dadurch weiter erleichtert, dass das Methionin und seine Derivate von Wasserstoffperoxyd leicht zur Sulfoxyd- und Sulfonstufe oxydiert werden und hierauf im Chromatogramm neue typische Positionen einnehmen. Eine dem experimentellen Teil beigegebene „Fleckenkarte“ orientiert über die mit und ohne H_2O_2 ermittelten Stellungen der im vorliegenden Zusammenhang interessierenden Verbindungen.

Die günstige gegenseitige Lage der Flecken gestattet es, ihre Grössen und Intensitäten in Verdünnungsreihen bekannter und unbekannter Anfangskonzentrationen nach dem Vorschlag von A. Polson visuell miteinander zu vergleichen und auf diese Weise die in Gemischen vorhandenen Substanzmengen annähernd zu bestimmen¹⁾. Wir

¹⁾ Biochim. biophys. acta **2**, 575 (1948). Vgl. auch R. B. Fisher, D. S. Parsons & G. A. Morrison, Nature **161**, 764 (1948).

haben uns davon überzeugt, dass die Methode auch bei mässigen Salzkonzentrationen und wechselnden pH-Werten (pH 6—10) für unsere Zwecke brauchbar bleibt.

Die Figuren 1 und 2 zeigen das Verhalten eines synthetischen Gemisches von Methionin, Methionyl-methionin¹⁾, Di-methionyl-methionin²⁾ und Methionin-isopropylester, ferner Verdünnungsreihen der beiden Peptide und schliesslich Verdünnungsreihen zweier typischer nasser Ansätze von racemischem Isopropylester mit krist. Chymotrypsin bzw. dänischem Ferment beim Eigen-pH der Lösungen. Erklärungen finden sich in den betreffenden Legenden sowie im experimentellen Teil.

Wie man sieht, stimmt das Fleckenmuster der Fermentreaktionsprodukte praktisch mit jenem des synthetischen Gemisches überein. Da sich diese Parallele in den — hier nicht gezeigten — Wasserstoffperoxydchromatogrammen wiederholt, kann kaum ein Zweifel bestehen, dass die Fermentreaktionslösungen das Di- und das Tripeptid des Methionins enthalten. Aus den Fleckenintensitäten lässt sich für die Produkte aus dem Chymotrypsin-Ansatz ein approximatives molares Verhältnis von Tripeptid : Dipeptid : Methionin von 1:0,6:9, für jene aus dem Ansatz mit dänischem Ferment ein solches von 1:1,3:10 ablesen. Auf insgesamt eingesetzten L-Methioninester bezogen, betragen die Ausbeuten (gleiche Reihenfolge) im ersten Fall rund 19, 8 und 59%³⁾, im zweiten Fall rund 19, 17 und 64%. Die wasserlöslichen Anteile aus trockenen Ansätzen liefern Chromatogramme, die sich von den eben besprochenen nur durch eine geringere Intensität der Peptidflecken unterscheiden. Es äussert sich hierin eine auffallende Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Esterkonzentration. Wir werden unten auf diese Beobachtung zurückkommen.

Über die präparative Isolierung der Peptide soll in einer späteren Abhandlung berichtet werden.

Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Zeit.

(Versuche mit DL-Methionin-isopropylester.)

Verfolgt man den Verlauf der nassen Fermentreaktion papierchromatographisch, so lässt sich folgendes erkennen: Esterverseifung und Peptidbildung setzen unmittelbar nach der Fermentzugabe ein. Die Mengen an Dipeptid, Tripeptid und Methionin nehmen hierauf ständig zu, bis nach etwa 8 Stunden der durch Figur 1 wiedergegebene Endzustand erreicht wird. Die Bildung schwer löslicher Produkte lässt sich am allmählichen Auftreten eines Niederschlages erkennen und von da an gewichtsmässig verfolgen. Die Verhältnisse sind in Tabelle 3 schematisch dargestellt.

¹⁾ Darstellung nach C. A. Dekker, S. P. Taylor & J. S. Fruton, J. Biol. Chem. **180**, 155 (1949).

²⁾ Darstellung: vgl. eine spätere Abhandlung.

³⁾ Ausserdem entstehen hier rund 14% unlösliche Peptide.

Tabelle 3.

Schematische Darstellung des zeitlichen Reaktionsverlaufes.

325 mg DL-Methionin-isopropylester, 5 mg kristallisiertes Chymotrypsin (*Armour*), 10 cm³ Wasser, 22°. Eigen-pH der Lösung. Die Länge der Pfeile (↔) ist ein willkürliches Mass für die visuell abgeschätzte Fleckengrösse und -intensität auf Chromatogrammen gleicher Beladung (1300 γ).

Zeit in Min.	Beschaffenheit des Rkts.-Gemisches	Papierchromatogramm der wasserlöslichen Anteile, relative Fleckengrösse		
		Dipeptid	Tripeptid	Methionin
2	klar	↔		↔↔↔
15	„	↔↔	↔↔	↔↔↔↔
35	Opaleszenz	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔↔↔
65	Trübung	↔↔↔↔	↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔
95	Flockung: 9 mg	↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔↔
210	„	↔↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔↔↔
390	„	↔↔↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔↔	↔↔↔↔↔↔↔↔↔
510	„ 20 mg	↔↔↔↔↔↔↔*)	↔↔↔↔↔↔↔*)	↔↔↔↔↔↔↔↔↔*)

*) Vgl. Fig. 1. Gehalt an Dipeptid, Tripeptid und Methionin ungefähr 10, 23 und 74 mg.

pH-Abhängigkeit der Peptidbildung. (Versuche mit DL-Methionin-isopropylester)

Figur 3 zeigt, dass die Peptidbildung in Gegenwart von dänischem Ferment bei pH 10 und insbesondere 9 am ausgeprägtesten ist, von dort bis pH 7 langsam abnimmt und bei pH 6 unvermittelt fast vollständig verschwindet. Im Gegensatz dazu erstreckt sich der Bereich der fermentativen Esterverseifung mindestens bis zu pH 5 hinunter. Dass hier nicht etwa nur eine spontane Verseifung vorliegt, ergibt sich aus dem Vergleich mit den fermentfreien Kontrollversuchen K₉ (pH 9), K₇ (pH 7) und K₅ (pH 5). Ein quantitativer Vergleich der Methioninflecken ist bei dieser Reihe unzulässig, weil einerseits die Mengen zu gross sind und anderseits die Fleckengrösse beim Methionin salzempfindlicher ist als bei den Peptiden.

Die angegebenen pH-Werte sind mit NaOH oder HCl eingestellt und während des Versuches im Hinblick auf Salzeffekte bei der Chromatographie nicht durch Zusatz von Puffern, sondern durch sorgfältig kontrollierte Laugezugabe innerhalb 0,2 Einheiten konstant gehalten worden (Glaselektrode). Entsprechende Versuche mit krist. Chymotrypsin wurden nicht ausgeführt, lassen aber ein ähnliches Ergebnis erwarten.

Das pH ungepufferter, nasser Ansätze liegt anfänglich bei ungefähr 9 und sinkt schliesslich auf etwa 8 hinab, fällt also beinahe mit dem Bereich optimaler Peptidbildung zusammen. Da das System über

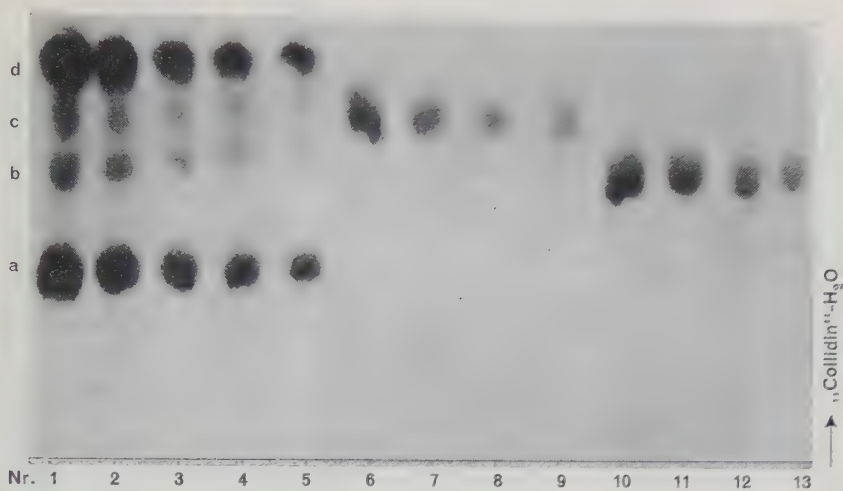


Fig. 1.

d = Methionin-isopropylester
c = Methionin-Tripeptid

b = Methionin-Dipeptid
a = Methionin

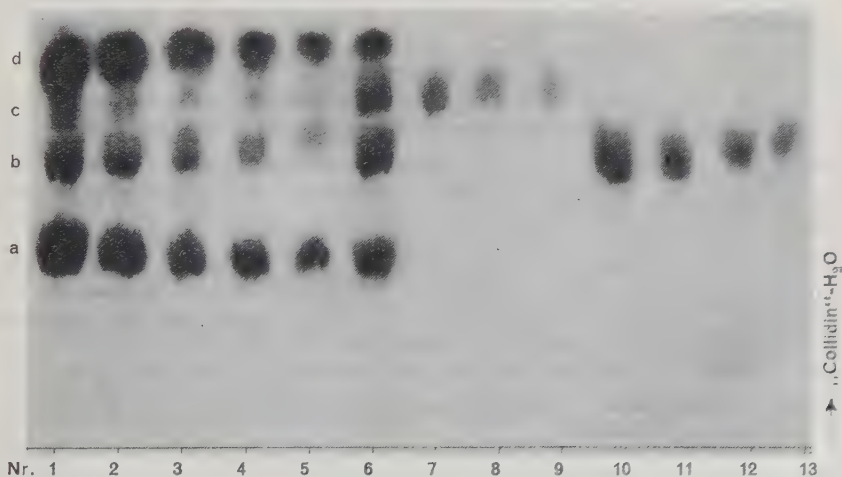


Fig. 2.

d = Methionin-isopropylester
c = Methionin-Tripeptid

b = Methionin-Dipeptid
a = Methionin

Legende siehe folgende Seite

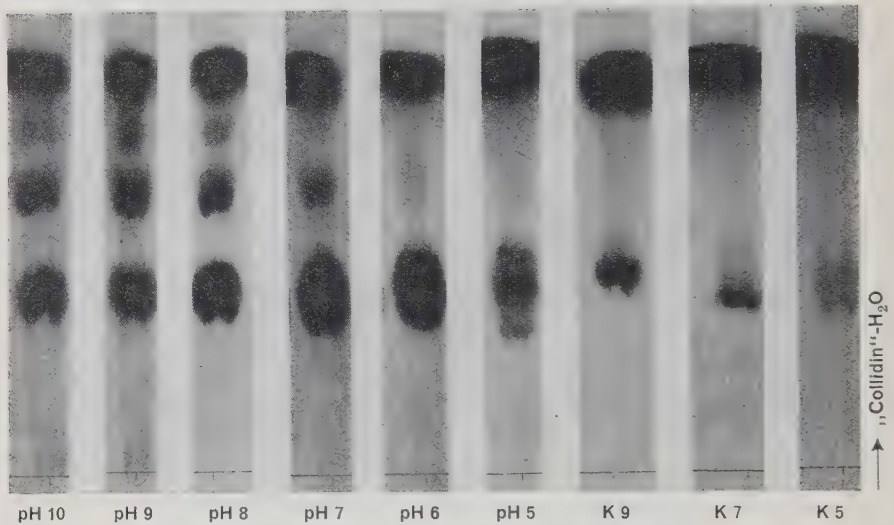


Fig. 3.

Legenden:

Fig. 1: Nr. 1—5: Chymotrypsin + DL-Methionin-isopropylester

Versuchsanordnung vgl. S. 585

Nr. 6—9: Synthetisches Methionin-Tripeptid: 120 γ , 60 γ , 30 γ , 15 γ

Nr. 10—13: Synthetisches Methionin-Dipeptid: 80 γ , 40 γ , 20 γ , 10 γ

Fig. 2: Nr. 1—5: „Dän. Ferment“ + DL-Methionin-isopropylester

Versuchsanordnung vgl. S. 585

Nr. 6: Synthetische Mischung von:

40 γ Methionin

+ 80 γ Methionin-Dipeptid

+ 120 γ Methionin-Tripeptid

+ 57 γ DL-Methionin-isopropylester

Nr. 7—9: Synthetisches Methionin-Tripeptid: 60 γ , 30 γ , 15 γ

Nr. 10—13: Synthetisches Methionin-Dipeptid: 80 γ , 40 γ , 20 γ , 10 γ

Fig. 3: pH-Abhängigkeit der enzymatischen Peptidbildung.

Versuchsanordnung:

325 mg DL-Methionin-isopropylester; 10 mg „dän. Ferment“; 10 cm³ H₂O

Temperatur: 22°, Versuchsdauer: 10 Stunden

pH-Einstellung und Kontrolle vgl. experimenteller Teil, S. 588.

Beladung der Chromatogramme überall 1300 γ .

Ferner Kontrollversuche K 9, K 7 und K 5 ohne Ferment bei pH 9, 7 und 5.

eine gewisse Selbstpufferung verfügt, ist sein Eigen-pH gut reproduzierbar und gegen Konzentrationsänderungen oder andere Einflüsse wenig empfindlich. Dieser Umstand gestattet es, zwischen pH 8 und 9 auf jede zusätzliche Pufferung zu verzichten und damit die papierchromatographisch lästigen Salzeffekte auszuschliessen. Dementsprechend sind sowohl die nachstehend besprochenen Experimente über den Einfluss der Ester- und Ferment-Konzentration, als auch jene, die den Figuren 1 und 2 und der Tabelle 3 zugrunde liegen, beim jeweiligen Eigen-pH der Lösungen durchgeführt worden.

Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Ester- und Ferment-Konzentration.

(Versuche mit DL-Methionin-isopropylester)

Das Mengenverhältnis von unlöslichen Reaktionsprodukten, wasserlöslichen Peptiden und freiem Methionin hängt stark von der Esterkonzentration ab.

Ist nur sehr wenig Wasser zugegen (trockener Ansatz), so gehen bei vollständigem Umsatz etwa 15% des angewandten racemischen Esters (30% der L-Komponente) in Peptidester oder Peptide über, welche in Äther und Wasser unlöslich sind. Die restlichen 70% L-Komponente werden hauptsächlich in freies L-Methionin umgewandelt. Daneben entstehen kleinere Mengen bisher nicht untersuchter, lipidlöslicher Peptidester und sehr wenig wasserlösliches freies Di- und Tripeptid¹⁾.

Tabelle 4 zeigt nun, wie die Ausbeute an diesen wasserlöslichen Peptiden in nassen Ansätzen auf Kosten der unlöslichen Produkte ansteigt, bis sie bei zunehmender Verdünnung im Moment des Verschwindens der letzteren ein Maximum erreicht. Verdünnt man noch weiter, so nimmt sie wieder ab, indem nun an Stelle von Peptiden vermehrt Methionin gebildet wird. Das Maximum liegt in Gegenwart von 5 mg krist. Chymotrypsin/10 cm³ bei einer Molarität von 0,08—0,17, in Gegenwart von 10 mg dänischem Ferment/10 cm³ bei einer Molarität von 0,17. Während durch das dänische Ferment etwa gleich viel Di- und Tripeptid gebildet werden, steht beim reineren Chymotrypsin die Tripeptidbildung im Vordergrund (vgl. Figur 1 und 2 sowie Tabelle 9). Es ist interessant, dass die maximale Totalausbeute an wasserlöslichen Peptiden in nassen Ansätzen ungefähr der maximalen Totalausbeute an unlöslichen Peptiden in trockenen Ansätzen entspricht.

Tabelle 5 vermittelt einen qualitativen Eindruck von der Veränderung des Reaktionsbildes bei variabler Ferment- und konstanter Ester-Konzentration.

¹⁾ Siehe experimenteller Teil: Beispiel eines trockenen Ansatzes.

Tabelle 4.

Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Ester-Konzentration.

DL-Methionin-isopropylester, 5 mg kristallisiertes Chymotrypsin (*Armour*)¹⁾, 10 cm³ Wasser, 22°, 10 Stunden, Eigen-pH der Lösung. Chromatogrammbeladung und Maßstab für Fleckengröße wie in Tabelle 3.

Ester-konz. mol/l	Trübung nach Min.	unlös. Peptide mg	Papierchromatogramm der wasserlöslichen Anteile, relative Fleckengröße		
			Dipeptid	Tripeptid	Methionin
0,34 ²⁾	10	44	↔	↔	↔
0,17	60	18	↔ ³⁾	↔ ³⁾	↔
0,085	—	—	↔	↔	↔
0,042	—	—	↔	↔	↔

¹⁾ Mit dänischem Ferment erhält man ein ähnliches Bild. Es unterscheidet sich nur dadurch, dass schon bei der Esterkonzentration 0,17-m. keine unlöslichen Peptide mehr entstehen und die Dipeptidflecken mit Ausnahme höchster Fermentkonzentrationen (Tabelle 5) die Tripeptidflecken an Grösse und Intensität überreffen.

²⁾ Vgl. experimenteller Teil: Beispiel eines nassen Ansatzes. Versuchsdauer 15 Stunden.

³⁾ Vgl. Fig. 1. Ausbeute an Dipeptid und Tripeptid rund 10 und 23 mg.

Tabelle 5.

Abhängigkeit des Reaktionsbildes von der Ferment-Konzentration.

Kristallisiertes Chymotrypsin (*Armour*), 325 mg DL-Methionin-isopropylester in 10 cm³ Wasser (c = 0,17-m.), 22°, Eigen-pH der Lösung. Versuchsdauer 10 Stunden (wasserlösliche Peptide) bzw. 24 Stunden (unlösliche Peptide). Chromatogrammbeladung und Maßstab für Fleckengröße wie in Tabelle 3.

Chymotr. mg	Trübung beginnt nach ungefähr	Unlös. Peptide mg	Papierchromatogramm der wasserlöslichen Anteile, relative Fleckengröße		
			Dipeptid	Tripeptid	Methionin
0,31	6 Stunden	3,5	↔	↔	↔
0,62	4 „	7,5	↔	↔	↔
1,25	3 „	11,5	↔	↔	↔
2,5	2 „	14	↔	↔	↔
5 ¹⁾	1 „	18	↔ ²⁾	↔ ²⁾	↔

¹⁾ Die Reihe ist unter Verwendung von dänischem Ferment bis zu einer Zugabe von 80 mg (entsprechend ungefähr 40 mg kristallisiertem Chymotrypsin) weitergeführt worden. Die Gesamtausbeute an wasserlöslichen Peptiden blieb dabei unverändert, dagegen war im Verhältnis Dipeptid:Tripeptid eine Verschiebung zugunsten des letzteren zu beobachten. Unlösliche Peptide werden vom dänischen Ferment in 0,17-m. Esterlösung nicht mehr gebildet.

²⁾ Vgl. Fig. 1. Ausbeute an Di- und Tripeptid rund 10 und 23 mg.

Die niederste Ester-Konzentration aus Tabelle 4 (0,04-m.) gibt mit 1 mg dänischem Ferment/10 cm³ (entsprechend ungefähr der niedersten Ferment-Konzentration aus Tabelle 5) noch namhafte Mengen Dipeptid.

Diskussion.

Die vorliegende Mitteilung stützt sich auf zahlreiche Versuche, die unter Verwendung von vier verschiedenen Fermentpräparaten durchgeführt worden sind und ohne Ausnahme einen fermentativen Aufbau von Methioninpeptiden erkennen liessen. Zwei dieser Präparate sind unter der Bezeichnung „kristallisiertes Chymotrypsin“ aus dem Handel bezogen und ein drittes nach einer bekannten Vorschrift¹⁾ zur Herstellung von Chymotrypsin bereitet worden. Es scheint deshalb berechtigt zu sein, die entdeckte Fermentwirkung dem Chymotrypsin selbst zuzuschreiben. Nun machen aber *S. Kaufman & H. Neurath* eine Angabe über die Chymotrypsinwirkung, die unseren eigenen Beobachtungen widerspricht. Die genannten Autoren erwähnen, dass krist. Chymotrypsin den Tyrosin-äthylester nur sehr langsam verseift²⁾. Unsere Präparate dagegen führen denselben Ester (L-Form) glatt in freies Tyrosin und weitere Substanzen über (Tyrosin-Dipeptid und -Tripeptid ?)³⁾. Ihre Benennung als Chymotrypsin erfordert daher noch eine gewisse Überprüfung.

Für den Augenblick indessen ist die Frage der Identität unserer Fermente weniger wichtig als die Tatsache ihrer Existenz und ihrer Wirkungsweise. Letztere besteht unter geeigneten Bedingungen darin, dass Aminosäureester in niedere freie Peptide übergehen. Man kann sich vorstellen, dass diese Synthese auf einer primären Ester-Kondensation und einem nachfolgenden Abbau gebildeter Peptidester beruht. Obschon diese Vorstellung plausibel erscheint und unsere Ergebnisse zu erklären vermag, ist noch eine weitere Möglichkeit in Erwägung zu ziehen. Eine thermodynamische Betrachtung zeigt nämlich, dass Reaktionen vom Typus



mit einer erheblichen Abnahme der Freien Energie verbunden wären (ΔF^0_{298} ungefähr -5000 cal)⁴⁾. Experimentelle Anhaltspunkte für

¹⁾ *J. H. Northrop*, Crystalline Enzymes, New York, 1939.

²⁾ Arch. Biochem. **21**, 437 (1949).

³⁾ Vgl. Tabelle 1.

⁴⁾ Die Rechnung basiert auf folgenden Überlegungen:

a) $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^- + ^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \rightarrow ^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}_2\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$; $\Delta F^0 = +4000$ cal.

b) $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$; $\Delta F^0 \sim +7300$ cal.

c) $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH} + \text{ROH} \rightarrow \text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOR} + \text{H}_2\text{O}$; $\Delta F^0 \sim +1500$ cal.

d) $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOR} + ^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \rightarrow ^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}_2\text{COO}^- + \text{ROH}$; $\Delta F^0 \sim -5000$ cal. Fortsetzung der Anmerkung siehe S. 581.

oder gegen das Vorliegen einer solchen Reaktionsweise existieren zur Zeit nicht. Der Nachweis von Peptidestern ist hierbei ohne Beweiskraft, weil die eine Kondensationsart die andere nicht auszuschliessen braucht.

Es ist uns bisher nicht geglückt, die Peptidsynthese ohne gleichzeitige Bildung von freier Aminosäure zu verwirklichen. Im Fall des Methionins entstehen in nicht zu verdünnter Lösung auf einen Gewichtsteil Peptide etwa zwei Gewichtsteile freies Methionin. Beim Threonin verschiebt sich das Mengenverhältnis zugunsten der Peptide, beim Phenylalanin und Tyrosin dagegen zugunsten der freien Aminosäuren. Tryptophanester scheinen überhaupt nur verseift zu werden (Tabelle 1). Die relative Peptidausbeute sinkt also in der Reihenfolge Threonin, Methionin, Phenylalanin¹⁾, Tyrosin¹⁾, Tryptophan. Interessanterweise nehmen die maximalen proteolytischen Koeffizienten ($C_{\max}$) bei der chymotryptischen Hydrolyse der entsprechenden Acylaminosäureester in derselben Reihenfolge zu²⁾. Der Abbau, welcher bei unsern Versuchen zu den freien Aminosäuren führt, gehorcht also in bezug auf die Aminosäureseitenkette den von *S. Kaufman & H. Neurath*²⁾ aufgestellten Gesetzmässigkeiten. Damit ist die Entstehungsweise der Aminosäuren allerdings noch nicht geklärt. Es kann sowohl eine direkte Esterverseifung als auch ein Abbau von Peptiden vorliegen. Im ersteren Falle würde das Geschwindigkeitsverhältnis von Esterverseifung und Peptidsynthese, im letzteren jenes von Peptidsynthese und Peptidhydrolyse das Reaktionsbild bestimmen. Beim Methionin ist anzunehmen, dass wenigstens ein Teil der freien Aminosäure aus Peptiden stammt. Die schwerlöslichen Peptide lassen sich hier, wenn auch langsam, enzymatisch abbauen. Ferner tritt die Peptidbildung in Gegenwart roher (peptidasehaltiger?) Fermentpräparate zugunsten der Methioninbildung völlig in den Hintergrund³⁾.

Im Hinblick auf die ausgeprägte Affinität zwischen unseren Chymotrypsinen und spezifischen Aminosäureestern einerseits und die

Fortsetzung von Anmerkung ⁴⁾, S. 580.

Vgl. zu:

a) *H. Borsook & J. W. Dubnoff*, J. Biol. Chem. **132**, 307 (1940).

b) *E. J. Cohn & J. T. Edsall*, Proteins, Amino Acids and Peptides, New York 1943, S. 99: $\log K_z(\text{Alanin}) = 5,41$.

c) *W. Hückel*, Theoret. Grundlagen der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 2, S. 537, gibt für die Gleichgewichtskonstante der Methylesterbildung von Fettsäuren (ausser Ameisensäure) einen mittleren Wert von $K = 5$ an. Ähnliche Werte von Veresterungskonstanten finden sich in *P. H. Groggins*, Unit Processes in Organic Synthesis, 3. Aufl., New York 1947, S. 620ff. Wir nehmen versuchsweise an, dass die Konstante für die Veresterung einer ungeladenen Aminofettsäure von derselben Grössenordnung sei.

d) Es ist $\Delta F_d^0 = \Delta F_a^0 - \Delta F_b^0 - \Delta F_c^0$. Die partielle Ionisierung des Aminosäureesters ($pK \sim 7,7$) in neutralem Milieu ändert das Ergebnis nur unwesentlich.

¹⁾ Die Plätze dieser beiden Aminosäuren sind möglicherweise zu vertauschen.

²⁾ *S. Kaufman & H. Neurath*, loc. cit.

³⁾ *M. Brenner & V. Kocher*, Helv. **32**, 333 (1949).

von *Neurath* und Mitarbeitern¹⁾ beobachtete Affinität zwischen Proteasen und acylierten Aminoestern andererseits stellt sich die Frage einer möglichen biologischen Bedeutung veresterter Aminosäuren und Peptide. Besteht insbesondere eine Beziehung zwischen der biologischen Peptidsynthese und der aufgefundenen Fermentreaktion? Von vornherein ist dies nicht ausgeschlossen. Eine Überschlagsrechnung zeigt nämlich, dass die Phosphatbindungsenergie zur Veresterung von Aminosäuren und Peptiden ausreichen dürfte²⁾. Die experimentell sichergestellte Kopplung zwischen Phosphatzerfall und Peptidsynthese könnte also prinzipiell über die intermediäre Bildung von Estern erfolgen. Mehr lässt sich vorläufig nicht aussagen. Vor allem bleibt die Natur der hypothetisch als Zwischenprodukte auftretenden Ester völlig ungeklärt. Die geringe „Esterspezifität“ der Fermentreaktion (Tabelle 2) lässt hier zahlreiche Möglichkeiten offen. Beim gegenwärtigen experimentellen Stand der Untersuchung ist jedenfalls eine gewisse Zurückhaltung in der Beurteilung der Ergebnisse geboten. Während die Entdeckung unserer enzymatischen Peptidsynthese die erst kürzlich wieder aufgeworfene Frage einer synthetischen Aufgabe der Proteasen³⁾ ohne Zweifel in ein neues Licht rückt, bleibt ihre Beziehung zum biologischen Aufbau der Peptidbindung bis auf weiteres eine blosse Arbeitshypothese. Dies gilt um so eher, als die Reaktion bisher erst bei einem einzigen Ferment mit Sicherheit beobachtet worden ist.

Experimenteller Teil.

1. Anwendung der Papierchromatographie⁴⁾ zur Analyse von Gemischen aus Methionin und Methioninpeptiden.

a) Methodik.

Sämtliche Chromatogramme sind nach der „ascending method“⁵⁾ mit *Whatman*-Papier Nr. 1 durchgeführt worden (Zylinderhöhe 28,5 cm). Als mobile Phase wurden verschiedene, in der Verteilungschromatographie gebräuchliche Lösungsmittel, wie Phenol, Butanol, Benzylalkohol u. a. m. ausprobiert. Die besten Resultate erhält man mit dem System Collidin⁶⁾/Wasser. Dank der hier günstigen Lage der Flecken können die Analysen eindimensional durchgeführt werden. Die Laufzeit unseres Collidins beträgt für eine Höhe von 28 cm bei einer Raumtemperatur von ca. 22° rund 19 Stunden. Anschliessend werden die Blätter 1½–2 Stunden bei 50–60° getrocknet. Entwickelt wird durch Behandlung mit einer 0,7-proz. Lösung von Ninhydrin in *n*-Butanol + 3-Vol-proz. Eisessig und anschliessendes 15–30minütiges Erwärmen auf 50–60°.

¹⁾ *S. Kaufmann & H. Neurath*, loc. cit.

²⁾ Nach Fussnote ⁴⁾ auf Seite 580 erfordert die Veresterung einer Aminosäure die Zufuhr von rund 9000 cal freier Energie. Der Phosphatzerfall dagegen liefert etwa 12000 cal (*F. Lipmann*, Adv. Enzymol. 1, 99 [1941]).

³⁾ *S. W. Fox, C. W. Pettinga, J. S. Halverson & H. Wax*, loc. cit.

⁴⁾ *R. Consden, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, Biochem. J. **38**, 224 (1944).

⁵⁾ *R. J. Williams & H. Kirby*, Science **107**, 481 (1948).

⁶⁾ „Collidin“ der *Schweiz. Teerindustrie AG.*, Pratteln, Kp. 164–171°.

b) Fleckenkarte einiger Derivate des Methionins.

Die nachfolgende schematische Zusammenstellung (Fig. 4) orientiert über die Lage der Flecken einiger im vorliegenden Zusammenhang wichtiger Derivate des Methionins. Es handelt sich dabei mehrheitlich um papierchromatographisch neue Substanzen.

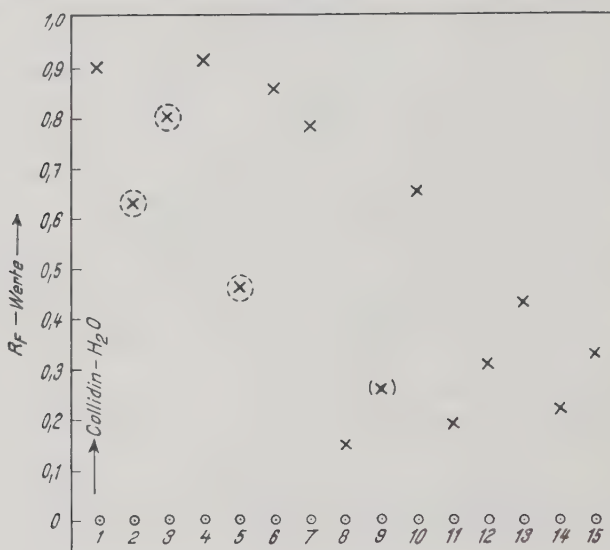


Fig. 4.

Fleckenkarte¹) einiger Derivate des Methionins.

Die Kreuze bezeichnen die durchschnittliche Lage der Flecken nach eindimensionalem Chromatographieren in Collidin/Wasser. Die Ringe bezeichnen die Stellen, wo die Lösungen aufgetropft wurden. Flecken, die mit $\otimes$ bezeichnet sind, sind in ihren Positionen relativ stark konzentrationsabhängig. Der mit (x) bezeichnete Flecken war schwach und unscharf und ist nur zum Vergleich mit Nr. 12 und 15 in diese Übersicht aufgenommen worden. Es bedeutet:

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. Methionin-isopropylester. | 8. } Oxydationsprodukte von |
| 2. } Oxydationsprodukte von Methionin- | 9. } Methionintriptid²). |
| 3. } isopropylester²). | 10. Methionindiptid. |
| 4. Methionindiptid-isopropylester. | 11. } Oxydationsprodukte von |
| 5. Oxydationsprodukt von Methionindiptid- | 12. } Methionindiptid²). |
| isopropylester²). | 13. Methionin³). |
| 6. Unbekannt (vermutl. Methionintetraptid). | 14. Methionin-sulfoxyd³). |
| 7. Methionintriptid. | 15. Methionin-sulfon³). |

¹) Vgl. „map of the spots“ bei C. E. Dent, Biochem. J. **43**, 169 (1948).

²) Nach Auftragen der Testsubstanz und anschliessendem Trocknen mit einem Tropfen 30-proz. H_2O_2 direkt auf dem Papier oxydiert, wiederum getrocknet und chromatographiert. — Auf eine chemische Analyse der Oxydationsprodukte wurde verzichtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit genügte es, wenn die enzymatisch gebildeten und die synthetisch hergestellten Verbindungen nach der Oxydation papierchromatographisch gleiches Verhalten zeigten. Dies war tatsächlich der Fall.

³) Die Lage dieser Flecken ist bereits von Dent, loc. cit., beschrieben worden. Seine Angaben stimmen trotz verschiedener Methodik und Verwendung anderer Collidin-gemische relativ gut mit unseren R_F -Werten überein.

c) Salzeffekte und pH-Kontrolle.

Fermentreaktionen werden in der Regel in gepufferter Lösung bei konstantem pH durchgeführt. Salzhaltige Lösungen lassen sich jedoch schlecht papierchromatographieren. Die Flecken werden verzerrt und schlierenförmig (tailing), und die R_F -Werte sinken merklich. Es ist aus diesem Grunde nötig, solche Lösungen zu entsalzen. Methoden, die sich hierzu eignen, sind in der Literatur verschiedentlich beschrieben worden¹⁾. Wenn immer möglich wird man aber schon der Einfachheit halber versuchen, die Reaktionsbedingungen so zu wählen, dass auf eine Entsalzung verzichtet werden kann.

Unsere Fermentversuche erfordern nun zur Fixierung des pH naturgemäss eine starke Pufferung. Das Mengenverhältnis zwischen gebildeten Peptiden und zuzufügendem Salz ist dabei auch im besten Falle (Konzentration an DL-Methionin-isopropylester 0,17-m.) derart ungünstig, dass eine papierchromatographische Auswertung ohne vorherige Entsalzung unmöglich wird. Vorversuche mit verschiedenen Puffergemischen lieferten schon bei ungenügenden Pufferkonzentrationen unbrauchbare Chromatogramme. Zur Umgehung der Entsalzung wurde daher folgende einfache Methode gewählt.

Die wässrige Methionin-isopropylesterlösung ($c = 0,17\text{-m.}$; $\text{pH} = 9,2$) wird mit Natronlauge oder Salzsäure auf das gewünschte pH gebracht (pH-Bereich 5–10), das Ferment zugegeben und der nun sofort einsetzende pH-Abfall durch fortwährende Zugabe kleinster Mengen Natronlauge kompensiert (Glaselektrode). Mit einem magnetischen Rührer sorgt man für rasche Verteilung der Lauge in der wässrigen Lösung. Das Reaktionsgemisch enthält auf diese Weise bei Versuchsabbruch relativ geringe Salzmen gen und lässt sich gut chromatographieren. Spezielle Kontrollversuche mit jeweils entsprechenden NaCl-Konzentrationen und pH-Werten haben hinsichtlich Lage, Intensität und Grösse der Peptidflecken keinen Salzeffekt erkennen lassen. Ein Beispiel findet sich auf Seite 589.

d) Beladung der Chromatogramme.

Unter der Beladung eines Chromatogrammes verstehen wir die auf das Papier gebrachte Substanzmenge. Diese Grösse ist bei der Analyse von Fermentreaktionslösungen nicht in einfacher Weise bestimmbar. In solchen Fällen geben wir als Beladung diejenige Menge Methioninester an, welche vor der Reaktion in dem zur Chromatographie aufgetropften Volumen vorhanden war. Da der Anteil an wasserlöslichen Peptiden in Fermentreaktionsgemischen verglichen mit unverändertem D-Ester und entstandenem L-Methionin relativ klein ist, und da die Fleckenintensität der Peptide bei einer gegebenen Substanzmenge von ihrer Molekulargrösse abhängt, muss in relativ hohen Konzentrationen chromatographiert werden. Es sind in der Regel bis zu 1300 γ Substanz, ausgedrückt als DL-Ester, aufgetragen worden. Um auch bei schwerer löslichen Verbindungen die gewünschte Beladung zu erreichen, werden verdünntere Lösungen mehrmals hintereinander auf dieselbe Stelle aufgetropft. Dazwischen wird jedesmal bei 50–60° getrocknet, um ein Auseinanderfliessen der Substanz zu verhindern.

In der Regel konnten die Versuchsbedingungen so gestaltet werden, dass sich die wässrige, filtrierte Lösung nach Abbruch der Fermentreaktion ohne vorheriges Konzentrieren direkt chromatographieren liess.

e) Chromatographie einer synthetischen Mischung und Nachweis von enzymatisch gebildetem Di- und Tripeptid. Figur 1 und 2.

Das papierchromatographische Verhalten von Methionin-Dipeptid und -Tripeptid im Gemisch mit Methionin und Methionin-isopropylester beansprucht im Hinblick auf die Zusammensetzung der Fermentreaktionsgemische besonderes Interesse. Wir haben deshalb eine entsprechende synthetische Mischung chromatographiert und festgestellt, dass die Lage der Peptide durch die genannten Begleitstoffe nicht beeinflusst wird. Aus Figur 2 geht klar hervor, dass die R_F -Werte in der synthetischen Mischung (2, Nr. 6) mit jenen

¹⁾ R. Consden, A. H. Gordon & A. J. P. Martin, Biochem. J. **41**, 590 (1947); A. F. Müller & F. Leuthardt, Helv. **32**, 2289 (1949).

der für sich allein chromatographierten Peptide (2, Nrn. 7—9 und 2, Nrn. 10—13) in vergleichbaren Konzentrationsbereichen übereinstimmen. Die in den Verdünnungsreihen sichtbaren, kleinen Veränderungen der R_F -Werte sind konzentrationsbedingt und gehören zum normalen Bild der Papierchromatographie¹⁾.

Zum Vergleich der Fleckenintensitäten und -größen sind die Substanzen im Mischchromatogramm in ungefähr äquimolaren Mengen aufgetragen worden. Man sieht, dass trotz Äquivalenz der Mengen Flecken von homologen Stoffen nur grob miteinander vergleichbar sind (2, Nr. 6).

Ausdrücklich hingewiesen sei auf die sehr schöne Übereinstimmung zwischen den Chromatogrammen des synthetischen (2, Nr. 6) und des enzymatischen Gemisches (2, Nrn. 1—5). Im Verein mit den hier nicht im einzelnen wiedergegebenen Resultaten der Wasserstoffperoxyd-Chromatogramme lassen die Bilder 1 und 2 keinen Zweifel an der Zuordnung der bei Fermentreaktionsprodukten auftretenden Flecken b und c bestehen: sie müssen auf dem Vorliegen von Methionin-Dipeptid und -Tripeptid beruhen.

f) Konzentrationsreihen und ihre Auswertung: Figur 1 und 2.

325 mg DL-Methionin-isopropylester in 10 cm³ Wasser ($c = 0,17$ -m, Bildungsoptimum für wasserlösliche Peptide) wurden mit 5 mg kristallisiertem Chymotrypsin (*Armour*) resp. 10 mg dänischem Ferment rund 12 Stunden bei 22° stehengelassen. Man filtrierte von wenig²⁾ unlöslichen Reaktionsprodukten ab und chromatographierte mit folgenden abgestuften Beladungen: Tabelle 6, Figuren 1 und 2. Auf denselben Papierbogen wurden ferner abgestufte Mengen von synthetischem Dipeptid und Tripeptid chromatographiert: Tabelle 7 und 8, Figur 1 und 2.

Tabelle 6.

Chromatographie der Reaktionsprodukte aus 325 mg DL-Methionin-isopropylester, 10 cm³ Wasser und 5 mg Chymotrypsin bzw. 10 mg dänischem Ferment (Fig. 1 und 2).

Figur 1 und 2 Nr.	Beladung der Chromatogramme		
	Reaktions- lösung	cm ³ aufgetropfte Lösung	γ DL-Methionin- isopropylester
1	unverdünnt	4 $\times$ 0,01	1300
2	„	2 $\times$ 0,01	650
3	„	1 $\times$ 0,01	325
4	doppelt verd.	1 $\times$ 0,01	162
5	vierfach verd.	1 $\times$ 0,01	81

Vergleicht man nun in den Chromatogrammen die verschiedenen „synthetischen“ und „enzymatischen“ Peptidflecken gleicher Lage hinsichtlich Intensität und Grösse, so ergeben sich aus Figur 1 die Daten der Tabelle 7 und aus Figur 2 die Daten der Tabelle 8.

Unter der Voraussetzung, dass die D-Komponente des racemischen Esters während der Reaktion unverändert bleibt und der gesamte L-Ester in Methionin und Di- bzw. Tripeptid übergeht, ergibt sich aus dem bei einer Gesamtbladung von 1300 γ ermittelten Anteil von Di- und Tripeptid (40 und 80 γ Dipeptid bzw. 90 und 90 γ Tripeptid, vgl. Kolonne 3 von Tabelle 7 und 8) das prozentuale und molekulare Verhältnis der Reaktionsprodukte³⁾. Da im übrigen 1300 γ einem Volumen von 0,04 cm³ Reaktionslösung ent-

¹⁾ R. B. Fisher, D. S. Parsons & G. A. Morrison, *Nature* **161**, 764 (1948).

²⁾ Im Falle des Chymotrypsins handelt es sich hier um 15—20 mg, beim dänischen Ferment um Spuren.

³⁾ Die genannte Voraussetzung ist beim Chymotrypsin-Ansatz nicht ganz erfüllt, indem dort rund 18 mg oder 14% des gesamten L-Methionins in Form unlöslicher Peptide ausfallen. Bei der Berechnung der Chymotrypsinwerte in Tabelle 9 ist dies berücksichtigt worden.

Tabelle 7.

Visueller Vergleich der Flecken aus Figur 1 und ungefähre quantitative Auswertung.

„Synthetische“ Flecken			entspr. „enzymat.“ Flecken		Peptidmengen auf Chromatogramm Nr. 1	
Tripeptid Nr.	Dipeptid Nr.	Menge in γ	Tripeptid Nr.	Dipeptid Nr.	Tripeptid	Dipeptid
9		15	3—4		schät- zungs- weise $90 \pm 30 \gamma$	
8		30	2—3			
7		60	1—2			
6		120				
	13	10		3		schät- zungs- weise $40 \pm 10 \gamma$
	12	20		2		
	11	40		1		
	10	80				

Tabelle 8.

Visueller Vergleich der Flecken aus Figur 2 und ungefähre quantitative Auswertung.

„Synthetische“ Flecken			entspr. „enzymat.“ Flecken		Peptidmengen auf Chromatogramm Nr. 1	
Tripeptid Nr.	Dipeptid Nr.	Menge in γ	Tripeptid Nr.	Dipeptid Nr.	Tripeptid	Dipeptid
9		15	3—4		schät- zungs- weise $90 \pm 30 \gamma$	
8		30	2—3			
7		60	1—2			
6		120				
	13	10		4		schät- zungs- weise $80 \pm 20 \gamma$
	12	20		3		
	11	40		2		
	10	80		1		

Tabelle 9.

Approximative Zusammensetzung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte aus 325 mg DL-Methionin-isopropylester, 10 cm³ Wasser und 5 mg Chymotrypsin bzw. 10 mg dänischem Ferment. Fehlergrenze ungefähr $\pm 30\%$ (Figur 1 und 2).

	Tripeptid		Dipeptid		Methionin	
	Chym.	dän. F.	Chym.	dän. F.	Chym.	dän. F.
Zusammensetzung in %	21	18	9	16	70	66
Anzahl Mole pro Mol Tripeptid	1	1	0,6	1,3	9	10
Konzentration in Millimol/Liter	5,5	5,5	3,6	7,1	50	54
mg/10 cm ³	23	23	10	20	74	81
Ausbeute in %, bez. auf einge- setztes L-Methionin ¹⁾	19	19	8	17	59	64

¹⁾ Der Chymotrypsinansatz liefert neben Methionin, Dipeptid und Tripeptid noch unlösliche Peptide. Ausbeute: 14%. Vgl. Fussnote ³⁾ auf Seite 585.

sprechen (Kolonne 3 von Tabelle 6), lassen sich auch die Konzentrationen und absoluten Mengen des entstehenden Methionin-Dipeptids und -Tripeptids angeben. Diese Daten sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich durchwegs um Näherungswerte mit einer Fehlergrenze von etwa $\pm 30\%$ handelt.

2. Durchführung der Fermentversuche.

a) Beispiel eines „trockenen“ Fermentansatzes.

8,67 g DL-Methionin-isopropylester, 90 mg kristallisiertes Chymotrypsin (*Lehn & Fink*), enthaltend 50% Magnesiumsulfat, und 420 mg Wasser werden gemischt und 19 Stunden bei 38° aufbewahrt. Man rührt hierauf das völlig erstarrte Reaktionsgemisch mit 30 cm³ Äther an, zentrifugiert, dekantiert und behandelt noch viermal in gleicher Weise mit je 30 cm³ Äther. Der unlösliche Rückstand wiegt lufttrocken 3,02 g (89% der Theorie). Er wird gemahlen und in einem Soxhlet-Apparat nochmals sechs Stunden mit Äther ausgezogen. Das in der Hülse zurückbleibende Produkt (2,78 g Aminosäure-Peptidgemisch) wird mit 4 cm³ Alkohol angefeuchtet und hierauf in 200 cm³ Wasser suspendiert. Man digeriert 6 Stunden, filtriert das Ungelöste ab, wäscht gründlich mit Wasser und trocknet es im Vakuum über Schwefelsäure. Ausbeute: 1,08 g „Peptide“.

Alle Ätherlösungen werden vereinigt, eingeeengt und der zurückbleibende Rohester (4,7 g) im Hochvakuum destilliert. Die Substanz dunstet ohne eigentliches Sieden bei 69–82° (0,1 mm, Bad 94–112°) über. Man erhält 3,75 g Ester mit einer Drehung $[\alpha]_D^{27} = +6,16^\circ$ (unverdünnt)¹⁾. Durch Verseifung mit Salzsäure und Entsäuerung mit Amberlite IR-4B werden daraus 2,1 g D-Methionin, $[\alpha]_D^{27} = -21,6^\circ \pm 0,2^\circ$ ($c = 5$ in 6-n. HCl) erhalten. Diese Drehung entspricht einer Mischung von etwa 95% D- und 5% L-Methionin. Zur Gewinnung von optisch reinem Methionin vgl.²⁾ Der Rückstand von der Destillation des D-Esters enthält neben wenig Zersetzungsprodukten die bisher nicht untersuchte lipidlösliche Peptidfraktion (rund 500 mg).

Der wässrige Extrakt wird im Vakuum zur Trockene verdampft. Er enthält viel L-Methionin und wenig wasserlösliche Peptide. Die letzteren lassen sich durch fraktionierte Kristallisation in den Mutterlaugen anreichern. Kocht man den gesamten wasserlöslichen Anteil zur Hydrolyse der Peptide mit 20-proz. Salzsäure, so erhält man nach dem Abdampfen der überschüssigen Säure und Entsäuerung des Hydrochlorids mit Amberlite IR-4B fast reines L-Methionin: $[\alpha]_D^{27} = +22,2^\circ \pm 0,2^\circ$ ($c = 5$ in 6-n. HCl).

Das Resultat ist praktisch identisch, wenn man an Stelle des *Lehn & Fink*-Präparates Chymotrypsin „*Armour*“, amorphes Chymotrypsin oder die doppelte Menge dänisches Ferment verwendet.

b) Beispiel eines „nassen“ Fermentansatzes.

5 cm³ DL-Methionin-isopropylester werden mit 50 cm³ Wasser 90 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die wässrige Phase des resultierenden Gemisches lässt sich im Scheidetrichter nur schlecht abtrennen. Man erhält indessen bei ein- bis zweimaligem Filtrieren durch Faltenfilter ein vollständig klares Filtrat. Dasselbe wird, um bei Temperaturschwankungen eine Übersättigung zu vermeiden, sofort mit 5% Wasser versetzt. Eine so bereitete Lösung enthält im Durchschnitt etwa 4,75 mg N/cm³ (*Kjeldahl*). Dies entspricht einer Esterkonzentration von 65 mg/cm³ oder 0,34 Mol/Liter.

20 cm³ obiger Lösung (1300 mg racemischer Ester) werden mit der Lösung von 10 mg kristallisiertem Chymotrypsin (*Armour*) in 1 cm³ Wasser versetzt und 15 Stunden bei 22° aufbewahrt. Man beobachtet nach 10 Minuten eine deutliche Trübung, nach 30 Minuten eine starke Trübung und nach 60 Minuten beginnendes Ausflocken eines Nie-

¹⁾ Die Drehung des Esters ist kein Maßstab für seine optische Einheitlichkeit, da sie durch Spuren von Feuchtigkeit verändert wird. Vgl. ²⁾.

²⁾ Helv. 32, 333 (1949).

derschlagtes. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert und die überstehende Lösung vom Rückstand abdekantiert. Das Dekantat, welches die wasserlöslichen Peptide, freies Methionin und unverbrauchten Ester enthält, wird zur Untersuchung direkt papierchromatographiert. Der Rückstand wird auf der Zentrifuge dreimal gut mit Wasser gewaschen (Waschwasser verwerfen) und anschliessend im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 88 mg wasserunlösliches Peptidgemisch. Mit amorphem Chymotrypsin und dem Präparat von *Lehn & Fink* erhält man ähnliche Resultate.

c) Beispiel eines pH-konstanten Versuches (pH 8). Vgl. Figur 3.

Hauptversuch:

Man bringt die Lösung von 325 mg DL-Methionin-isopropylester in 10 cm³ Wasser durch vorsichtige Zugabe von 1-n. Salzsäure (0,35 cm³) auf pH 8,05 (Glaselektrode, magnetischer Rührer, 18°) und versetzt anschliessend mit 10 mg dänischem Ferment, gelöst in 0,25 cm³ Wasser. Das pH ändert sich zunächst nicht, beginnt dann aber unter dem Einfluss der alsbald einsetzenden Fermentreaktion langsam abzusinken. Man wartet, bis es unter 8 gefallen ist und stellt nun durch Zugabe von Lauge wieder auf den Anfangswert ein. Diese Korrektur wird jedesmal bis zum Abklingen der Reaktion wiederholt. Lokale Erhöhungen der Alkalikonzentration sind hiebei durch kräftiges Rühren zu vermeiden. Nach Versuchsabbruch wird von Spuren unlöslicher Produkte abfiltriert und direkt chromatographiert (Figur 3, pH 8). Die nachstehende Tabelle 10 orientiert an Hand des Laugeverbrauches über den zeitlichen Verlauf der Umsetzung.

Tabelle 10.

Laugeverbrauch bei pH 8¹⁾

Zeit Stunden	0,25-n. NaOH cm ³	pH	
		vor Zusatz	nach Zusatz
0	—	8,05	—
1	0,14	8,00	8,05
2	0,29	7,98	8,05
2,5	0,44	7,98	8,05
4	0,64	7,97	8,06
5,2	0,81	7,98	8,05
7,3	0,95	7,98	8,05
9,4	—	8,03	—

Die zeitliche pH-Änderung hängt bei gegebener Reaktionsgeschwindigkeit vom pH der Lösung ab (variable Eigenpufferung). Auch der beobachtete Totalverbrauch an Lauge ist pH-abhängig. Die in der Tabelle angegebenen Werte enthalten keine Korrektur für die gleichzeitige spontane Verseifung (vgl. Kontrollversuch). Zur kinetischen Auswertung sind die Daten ungeeignet, da ihnen eine Vielzahl von Einzelvorgängen und Reaktionsprodukten zugrunde liegt. Wir verzichten aus diesem Grunde auf eine detaillierte Wiedergabe der übrigen pH-Versuche.

¹⁾ Eichung gegen 0,025-m. Phosphat (6,86) und 0,01-m. Borat (9,17).

kuchen wird in Essigester gelöst und das Hydrochlorid durch Zusatz von Petroläther zur Kristallisation gebracht. Man erhält 1,45 g D-Methionin-isopropylester-hydrochlorid (90% der Theorie). Die Substanz schmilzt bei 112–116°, rekristallisiert teilweise und schmilzt endgültig bei 122° (korr., Kofler-Block). Zur Drehung und Analyse wird 12 Stunden über P₂O₅ am Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

C₈H₁₈O₂NCIS (227,7) Ber. N 6,17% Gef. N 5,96%

$[\alpha]_D^{17} = -13,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol)

Aus L-Methionin¹⁾ entsteht in gleicher Weise das L-Methionin-isopropylester-hydrochlorid (N gef. 5,92%). Es schmilzt und dreht (mit umgekehrtem Vorzeichen) wie die D-Form.

Zusammenfassung.

Die Ester des Methionins und einiger anderer spezifischer Aminosäuren reagieren in Gegenwart von Wasser und käuflichen Präparaten von kristallisiertem Chymotrypsin unter Bildung von Peptiden.

Durch sorgfältige papierchromatographische Analyse ist unter den Reaktionsprodukten aus DL- bzw. L-Methionin-isopropylester Methionyl-methionin und Methionyl-methionyl-methionin nachgewiesen worden. Unter geeigneten Bedingungen werden insgesamt etwa 30% der L-Form des eingesetzten Esters in diese Produkte übergeführt; der Rest fällt hauptsächlich als L-Methionin an.

Die Bildungsweise der Peptide wird diskutiert und ihre mögliche Beziehung zum Mechanismus der biologischen Peptidsynthese erörtert.

Im Zusammenhang mit der Ausarbeitung der analytischen Methodik ist das papierchromatographische Verhalten einiger Methioninderivate im Collidin/Wasser-System untersucht worden. Eine Fleckenkarte orientiert über die erhaltenen Daten.

¹⁾ Helv. **32**, 333 (1949).

Curriculum vitae.

Geboren am 10. November 1923 in Winterthur. Dasselbst 6 Jahre Primar- und 5 ½ Jahre Kantonsschule. Unterbrechung der Mittelschule zur Absolvierung eines einjährigen Kurses am Genfer Konservatorium in der Ausbildungsklasse von Alexandre Mottu (Klavier). Anschliessend 1 ½ Jahre Mittelschule am Institut Tschulok in Zürich. Eidg. Maturitätsprüfung Typus B Frühjahr 1944 in Bern. Im Herbst 1944 Beginn des Chemiestudiums an der ETH. in Zürich: Herbst 1945 erstes Vordiplom, Herbst 1946 zweites Vordiplom, Frühjahr 1948 Schlussdiplom und Immatrikulation an der Universität Basel. Dasselbst Ausführung der vorliegenden Arbeit im Laboratorium von Herrn Prof. Reichstein unter der Leitung von PD. Dr. M. Brenner.

